Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. B.

Versuche über Gewöhnung an Arsen, Antimon, Quecksilber und Kupfer bei Infusorien.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung der Medizinischen Doctorwürde

VORGELEGT DER

MEDIZINISCHEN FACULTÄT

DER

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT ZU FREIBURG I. Br.

VON

HUGO NEUHAUS,

aus Ellwangen a. I.

Separatabdruck aus

ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE

XX. Band.

BRUXELLES
H. LAMERTIN, ÉDITEUR,
20, RUE DU MARCHÉ-AU-BOIS.

PARIS
O. DOIN, ÉDITEUR,
8, PLACE DE L'ODÉON.

1910.

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. B.

Versuche über Gewöhnung an Arsen, Antimon, Quecksilber und Kupfer bei Infusorien.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung der Medizinischen Doctorwürde

VORGELEGT DER

MEDIZINISCHEN FACULTÄT

DER

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT ZU FREIBURG I. Br.

VON

HUGO NEUHAUS,

aus Ellwangen a. J.

ACAD. LAUGHBAT. BIBL.

Separatabdruck aus

ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE

XX. Band.

BRUXELLES
H. LAMERTIN, ÉDITEUR,
20, RUE DU MARCHÉ-AU-BOIS.

PARIS
O. DOIN, ÉDITEUR,
8, PLACE DE L'ODÉON.

1910.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Facultät der Universität Freiburg i. B.

Referent,
Prof. STRAUB.

Dekan,
Prof. DE LA CAMP.

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. B.

Versuche über Gewöhnung an Arsen, Antimon, Quecksilber und Kupfer bei Infusorien

von

HUGO NEUHAUS,

Med.-Prakt.

Das Problem der Giftgewöhnung bei Protozoen, das den Gegenstand vorliegender Untersuchungen bildet, hat die Forschung schon zu einer Zeit interessiert, da die Kentnisse über einzellige Organismen als Krankheitserreger einen noch recht bescheidenen Umfang hatten. Viele Versuche der Giftgewöhnung niederer Organismen aus früherer Zeit die vielfach zum Zwecke morphologischer Studien unternommen worden waren, erlangen neuerdings, seitdem die Protozoennatur der Erreger vieler Menschen- und Tierseuchen erkannt ist, erhöhte Bedeutung.

Einige bemerkenswerte Beobachtungen, die sich auf die Anpassungsfähigkeit niederer Tiere an schädliche chemische Angentien beziehen, seien hier wiedergegeben : Obenan stehen die zahlreichen Untersuchungen, die sich die Gewöhnung mariner Organismen an Süsswasser und andererseits die Anpassung von Süsswassertieren an Salzwasser zum Ziel gesetzt hatten. Alle hierhergehörenden Versuche stellen eigentlich nur die Bemühung der Forscher dar, das grosszügige Experiment nachzuahmen, das sich unter bestimmten Verhältnissen in der Natur selbsttätig vollzieht. Man weiss, dass Binnenseen die einmal im Zusammenhang mit dem Meer standen und deren Salzgehalt durch ständiges Zuströmen von Süsswasser allmählich stark vermindert wird, immer einige wenige Tiertypen beherbergen, die sich den neuen Bedingungen angepasst haben. Der Tanganikasee und die Schweizer Seen z. B. enthalten marine Turbellarien, und in den gros-

sen Binnenseen Nordamerikas leben viele Protisten, wie sie typisch in den benachbarten Meeren gefunden werden. Umgekehrt hat man in Salzseen, deren Salzconcentration durch langsame Wasserverdunstung bei spärlichem Zufluss neuen Wassers zugenommen hatte, die Anpassung vereinzelter Tiere beobachtet. In Elsass Lothringen wurden von französischen Forschern lebende Flagellaten in salzgesättigten Tümpeln, auf deren Grund sich eine Schicht von Salzkristallen befand, gefunden. Und LOER berichtet, in dem californischen Owens Lake lebende Infusorien, Copepoden und Ephydralarven gesehen zu haben, trotzdem der Sodagehalt des Wassers 2,5 % betrug. Diesen an natürlichen Verhältnissen erhobenen Befunden stehen die experimentell festgelegten Tatsachen gegenüber, von denen uns die bemerkenswerteste das Ergebnis der Versuche ENGELMANNS scheint. Diesem Forscher gelang es Seewasserprotozoen an einen Salzgehalt von 10 % zu gewöhnen. In den gleichsinnigen Versuchen einer Reihe anderer Autoren wurden die Tiere an Salzkonzentrationen gewöhnt, die den Salzgehalt des ursprünglichen Milieus um das Doppelte bis Dreifache übertrafen. Während es sich bisher nur um Variationen osmotischer Eigenschaften handelte, beschritten neue Bahnen die Experimente DAVENPORTS und NEALS (6) (*) aus denen hervorgeht dass Stentoren, die 2 Tage in einer 0,00005 % Sublimatlösung gehalten wurden, sich gegen eine letale Dosis $HgCl_2$ 4 mal so widerstandsfähig erwiesen als normale Tiere. Für Chinin ergaben sich aus ihren Untersuchungen ähnliche Resultate. In jungster Zeit berichten PROWAZEK und GIEMSA (9) über Chininfestigungen bei Colpidien. Durch vorsichtiges und langsames Zugiessen einer 1 : 10000 Chininhydrochlorid-Lösung liessen sich die Versuchstiere an eine Concentration von 1 : 5300 gewöhnen, während für den Ausgangsstamm 1 : 6000 tötlich war. Diesen Ergebnissen reihen sich ähnliche in I. FRANK DANIELS (5) « Adaptation and Immunity of lower organisms to ethyl Alkohol » an. Er fand, dass Stentor und Spirostomum, die einige Tage in 1 % Alkohol lebten, eine erhebliche Resistenzerhöhung gegen tötliche Alkoholdosen zeigten.

In ein neues Stadium und in den Brennpunkt des Interresses sind die Anpassungsversuche bei Protozoen durch die Ehrlichschen (7) Trypanosomenarbeiten gerückt. In den chemotherapeutischen Trypanosomenstudien sind wichtige Tatsachen niedergelegt, auf die hier mit ein Paar Worten eingegangen werden soll. Bekanntlich gelang es EHRLICH und seinen Schülern, den Trypanosomen innerhalb des Tierkörpers Festigkeit gegen fast sämtliche der üblichen und bis dahin bei der Vernichtung der Parasiten erprobten Mittel anzuzüchten. Die Festigkeit war keine absolute, d. h. sie überschritt bestimmte, durch die

(*) Litteratur am Ende der Abhandlung

Natur des Wirtstiers gesetzte Grenzen nicht. Im Verlauf seiner Versuche war es EHRLICH geglückt, Trypanosomenstämmen erhebliche Widerstandsfähigkeit gegen basische Triphenylmethanfarbstoffe (Typ : Fuchsin) gegen Benzidinfarbstoffe (Typ : Trypanblau) und gegen die äusserst wirksamen und praktisch bedeutsamen organischen Arsenverbindungen (Atoxyl, Arsacetin, Arsenophenylglycin) beizubringen. Alle Versuche aber, die Parasiten gegen die arsenige Säure, der nach bis dahin gemachten Erfahringen bedeutende Wirksamkeit gegen die Trypanasomen zukam zu festigen blieben ohne den erwarteten Erfolg, und EHRLICH gelangt zu dem Schluss, dass es bei Verwendung kleiner Wirtstiere jedenfalls nicht gelinge, den Parasiten Resistenz gegen arsenige Säure anzuzüchten. Merkwürdigerweise erwiesen sich die gegen Arsenophenylglycin gefestigten Tiere gegenüber der arsenigen Säure so widerstandslos wie die normalen Ausgangstiere. Denselben Befund konnte NEVEN (15) bei seinen Reagensglasprüfungen erheben : die arsenige Säure beeinflusst in vitro die mit und gegen hochwirksame organische Arsenverbindungen gefestigten Stämme genau so wie die normalen. Darnach schien es verlockend, das Verhalten der Protozoen gegenüber arseniger Säure zu prüfen.

Die Trypanosomen verboten sich bei der Schwierigkeit, sie ausserhalb des Tierkörpers weiterzuzüchten, für unsere Untersuchungen von selbst. Die Versuche an einen gegen arsenige Säure selbst sehr empfindlichen Wirtsorganismus anzustellen, war ebenso unmöglich. Wir griffen also, um einerseits die Störungen und Complicationen eines vielzelligen Wirtsorganismus zu umgehen und andererseits ein jederzeit weiterzüchtbares Protozoenmaterial zur Verfügung zu haben, zu Infusorien.

Unsere Untersuchungen, zu denen wir uns jetzt wenden, hatten zunächst, vielleicht infolge der Ungunst der Jahreszeit mit einigen Schwierigkeiten der Infusorienzüchtung zu kampfen. Unsere Arbeit fiel in die Zeit von Januar bis April. In den Heu, -Krautblätter, Laubaufgüssen, die bei Zimmer und Thermostatentemperatur (30° C.) entsprechend lange Zeit aufgestellt, täglich untersucht wurden, fanden sich während des Monats Januar keine brauchbaren Infusorien.

Däs Bemühen, aus Tiechmuschelflüssen oder-Kiemen Paramäcien zu bekommen war so ergebnislos wie der Versuch, die Infusorien der Froschenddarms — wegen ihrer Grösse und Beweglichkeit zu schätzendes Material — länger als einen Tag zu erhalten, geschweige denn weiterzuzüchten ; auch nicht in der von PÜTTER (17) für Opalinen empfohlenen Lösung. In führenden Werken über Protozoenkultur vermissten wir Angaben darüber, wie der Schwierigkeiten Herr zu werden ist, die die Wintermonate der Gewinnung geeigneten Infusorienmaterials entgegenstellen.

Zu unseren ersten Versuchen gewannen wir schliesslich aus unseren Infusen, Colpidien und zwar Colpedium colpoda, das sich ohne besondere Schwierigkeit rein d. h. ohne Vermischung mit anderen Infusorien züchten liess. Als Kulturlösungen dienten uns 2 % Gelatineheudekokte und 2 % Gelatineeiweisslösugen. Beide von saurer Reaktion wurden vor der Beschickung mit Colpidien mit Soda neutralisiert. Für die Züchtung in Reagensgläsern eignet sich sehr gut eine 5 % Agarheudekoktmischung die man im Reagensglas schräg erstarren lässt und mit entsprechenden Mengen Wassers überschichtet. Die Methode von BALBIANI mit den in Gace verpackten Heupäckchen, die man in die Flüssigkeit hängen lässt, um sie von Zeit zu Zeit zu erneuern, ist für die Züchtung in grösseren Gefässen sehr zweckdienlich.

Die Paramäcien, deren wir uns bei unseren weiteren Versuchen bedienten, entstammten einer alten mit Flagellaten etc. vermischten Kultur des zoologischen Instituts. Durch Einhaltung der Winke die ROESSLE (20) für die Züchtung von Paramäcien gibt, erhielten wir ein ausreichendes und reines Ausgangsmaterial. Die Züchtung fand unter folgenden Bedingungen statt : in hohe, mit abgestandenem Leistungswasser erfüllte Bechergläser liessen wir in Gacepäckchen verpackte, feingeschnittene und kurze Zeit in kochendes Wasser getauchte Salatblätter hängen. Zur Beschleunigung der Fäulniss wurden die Kulturlösungen für 1-2 Tage in den Thermostaten von 30° C gebracht. Nun wurden die Gläser mit einigen Pipetten des Urstamms beschickt. Unter günstigen Bedingungen vermehrten sich die Tiere in weniger Tagen so rasch, dass die oberflachliche Schicht der Kulturlösung von der Fülle der Infusorien getrübt erschien. Öfters trat, offenbar bei zu grossen Mengen von Salatblättern, eine milchige Trübung der Zuchtflüssigkeit auf, die stets mit ausgesprochen saurer Reaktion einherging und die Entwicklung der Paramäcien stark beeinträchtigte, wenn nicht ganz hemmte. Nach entsprechender Verdünnung wurden auch solche Lösungen wieder brauchbar. Im ganzen sind die Paramäcien ein viel empfindlicheres Protozoenmaterial als etwa die Colpidien, und für ein gutes Gedeihen hat man vor allen auch auf gleichmässige, nicht zu tiefe Temperatur des Umgebens zu achten. Um die Kulturen längere Zeit brauchbar zu erhalten, ist es nötig, den Vorschriften STATKEWITSCHS (24) gemäss die Lösungen öfter umzurühren, die Kahmhaut abzuschöpfen und das verdunstete Wasser durch frisches zu ersetzten. Zur Auswertung des etwa gewonnenen Resistenzzuwachses wurden die Versuchstiere in markirten Pipetten aus den Stammflüssigkeiten in Uhrschälchen verbracht. Die Beobachtung geschah bei den Colpidien mit dem Mikroskop, für die

Paramäcien genügte meist Lupenvergrösserung. Im gelähmten Zustand bedeckten sie schon mit blossem Auge sichtbar, als ein helles Klümpchen sedimentähnlich den Grund des Uhrschälchens, während die freibeweglichen Tierchen mehr als diffuse Trübung erschienen. Es ist kaum nötig zu sagen, dass peinliche Sauberkeit aller Utensilien unbedingtes Erfordernis für die Untersuchung ist, besonders von dem Augenblick an, in dem man mit sehr wirksamen Giften arbeitet. Unsere Giftlösungen wurden nicht mit destilliertem sondern mit Brunnen Wasser hergestellt, aus Gründen von denen noch bei den Kupferversuchen die Reden sein soll.

Die Temperatur, bei der unsere Versuche veranstaltet wurden, ist in den Protokollen nicht vermerkt. Sie entsprach einer ziemlich konstanten Zimmertemperatur von 17° C.

Über dass allgemeine Verhalten der verwendeten Infusorien sind noch einige Worte zu sagen. Die Colpidienkulturen, die zunächst den Versuchszwecken dienten und nicht weniger die Paramäcienstämme zeigten wie natürlich je nach Alter, Ernährungszustand, Aufzuchtsbedingungen, gegen die ihnen beigebrachten Stoffe ein quantitativ wechselndes Verhalten.

Es war also nötig, möglichst gleichaltrige und unter denselben Verhältnissen gezüchtete Stämme zu benutzen, wenn es galt, Vergleiche zwischen normalen unbeeinflussten und gefestigten Tieren zu ziehen. Das ist fast selbstverständlich. Auf einen Punkt aber kann nicht nachhaltig genug hingewiesen werden : die individuellen Verschiedenheiten der einzelnen Exemplare ein und derselben Kultur überstieg manchmal alle Erwartung. Die individuellen Schwankungen erreichen oft geradezu ungeheure Werte, wovon bei Gelegenheit noch die Rede sein soll. Diese Tatsache ist nicht wunderbar für den, der das ständige Gehen und Kommen in einer Kultur beobachtet hat, bereitet aber allen denen viele Enttäuschungen die in der Schar der Infusorien ein gleichmässig discipliniertes Heer Soldaten zu finden hoffen.

Für die Feststellung des Verhaltens gegen wenig wirksame Stoffe ist natürlich eine tagelange Beobachtung unerlässlich. Das erschwert die Aufstellung genauer Werte. Ebenso war es bei der grossen Zahl der verwendeten Tiere nicht möglich, relative Begriff, wie « viel, die meisten », u. dgl. zu umgehen. Diese Schwierigkeiten mögen bei Betrachtung unserer Tabellen berücksichtigt werden.

Für die letalen Erscheinungen der Infusorien haben wir zur Abkürzung einige Ausdrucke gewählt, die einer kürzen Erklärung bedürfen. Auf die mannigfaltigsten Reize antworten die Colpidien mit eine Einkugelung, die sich je nach der Intensität des Reizes

mehr weniger rasch vollzieht. Die Beweglichkeit ist in diesem Stadium zunächst in schwachem Grade erhalten, um freilich bald zu erlöschen. Den Zustand kennzeichneten wir als « Kugeln ». Als den Augenblick des Todes notierten wir den, in dem sich eine Zustandsänderung des Cytoplasmas vollzog, die sich kundgibt im Zerfliessen, Platzen, Schrumpfen und die wir ein für allemal mit dem Wort « Schatten » bezeichnet haben. Darunter sind also alle toten Tiere verstanden die in ihrem Aussehen eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Bilde eines Blutkörperchenschattens hatten.

Bei den Paramäcien haben wir ebenfalls die Bezeichnung Schatten für den morphologischen Zustand gewählt, der wie der Schatten der ursprünglichen Gestalt imponiert. Das Kriterium des Todes war für sie die nach der Unbeweglichkeit der Cilien auftretende Gestaltsveränderung wie Zusammenschrumpfen, Platzen u. a. Natürlich konnten diese Veränderungen nur mit dem Mikroskop festgestellt werden.

1. Arsenige Säure.

Bevor wir uns zu den Versuchen mit arsenigen Säure wenden, seien die Erfahrungen, die wir mit einigen organischen Arsenpräparaten gemacht haben, gestreift. Arsacetin und einige ähnliche Substanzen haben, selbst in starken Concentrationen, auf die Colpidien so wenig Einfluss, dass beispielweise ein in 2 % wässriger Arsacetinlösung gehaltenen Stamm nach 42'' keine bemerkenswerte Beeinträchtigung zeigte und, in frische Culturlösung verbracht, sich rasch vermehrte. Die unter vorsichtiger Zugabe einer 2 % wässriger Arsacetinlösung gezüchteten Tiere verfielen der Wirkung einer tötlichen Lösung von arseniger Säure in derselben Zeit wie normale unbeeinflusste Infusorien. Über die Beobachtung des Verhaltens gegen Sublimat wird an der geeigneten Stelle berichtet werden.

Die arsenige Säure aber hat für die Colpidien nicht die starke Wirkung, wie nach früherer Beobachtungen SANDS an Stylonychia pustulata zu erwarten war : arsenige Säure in der Concentration 1 : 1000 tötet in wenigen Minuten das genannte Infusor. Und die Trypanosomen, die NEVEN (15) freilich unter ungünstigen Bedingungen beobachtete, widerstanden einer 1 % Lösung nicht länger als 3 Minuten. Unsere Colpidien wurden von einer gesättigten, wässrigen Lösung von As_2O_3 in rund 20 Minuten getötet. Dabei wurden natürlich immer einige besonders resistente Exemplare beobachtet, die unter Umständen der Einwirkung dieser Concentration noch länger trotzten. Wegen dieser individuellen Schwankungen war es nicht angängig, die Zeit, bis zu der *alle* Tiere getötet waren, als Standardzeit zu fixieren.

Unsere Zeiten sind vielmehr so gefunden : nach Zugabe der Giftlösung — gewöhnlich zu 0,5 ccm Colpidienlösung 0,5 ccm der über den Tabellen vermerkten Concentration — wurde der Augenblick notiert, in dem bei dem Versuchsstamm eine gegenüber dem normalen deutlische Beeinträchtigung der Tiere zu constatiren war. Diese Schädigung konnte nur durch die bekannten Symptome der Beweglichkeitsherabsetzung oder am ausgesprochensten durch die Veränderung des Cytoplasmas (Zerfliessen, Platzen) gekennzeichnet werden. Da wir mit keiner unserer Concentrationen eine augenblickliche Tötung erzielen konnten, so war es nicht möglich, durch die Stärke der Lösung, mit der die vorbehandelte Tiere zu töten waren, das Mass der gewonnenen Resistenz auszudrücken (z. B. normal mit 1,75 % Lösung augenblicklich zu töten : gefestigt augenblicklich mit 2,5 % zu vernichten). Es blieb also nur übrig, der Zeitdauer, während der sich der gefestigte Stamm etwa gegen eine bestimmte tötliche Concentration länger resistent erwies als der Normalstamm, den Grad der gewonnenen Widerstandsfähigkeit zu entnehmen.

Die Vorbehandlung der Colpidien geschah in folgender Weise : die mit frischer Zuchtflüssigkeit gefüllen Reagens-oder Bechengläser wurden zunächst mit volumetrisch gleichen Mengen von Infusorien *einer* Colonie beschickt. Die Gewöhnung an arsenige Säure versuchten wir durch vorsichtige Zugabe einer entsprechend dünnen Lösung zu erreichen. Die Zuchten wurden in 3 Serien mit Konzentrationen von 1 : 1 Million, 1 : 100000, 1 : 10000 wässriger Arsenigesäurelösung versetzt. 4 Tage nach einander wurden stets gleiche Mengen der Lösung zugegeben ; die Endkonzentration der Zuchtflüssigkeit wurde bei diesen Gewöhnungsversuchen nicht festgestellt. Eine Überdosierung fand in keinem Falle statt. Dafür hatten wir an dem Grad der Vermehrung einen sicheren Masstab. Die Resistenz in solcher Weise vorbehandelter Infusorien, gemessen an dem Verhalten gegen tötliche $As_2 O_3$ Concentrationen (1 : 200-1 : 2000) erwies sich in keinem der zahlreichen Versuche erhöht. Resistenz hofften wir aber sicher, zu beobachten, wenn wir die bei vielen Versuchen lange nach der üblichen Zeit noch überlebenden, mit anderen Worten, die primär resistenten Tiere weiterzüchteten. Trotzdem sie meist in ihrer Fortpflanzungsfähigkeit nicht geschädigt waren, wovon wir uns an dem raschen Angehen dieser Kulturen überzeugten, zeigten sie in den mit ihnen angestellten weiteren Versuchen ebenso wenig Festigkeit wie der Stamm, dessen letzter tapferer Rest sie gewesen waren.

Diese merkwürdigen Resultate veranlassten uns später zur Prüfung an einem anderen Protozoenmaterial, an Paramäcium caudatum. (Concentrierte) Gesättigte wässrige Lösung tötet sie in rund 10 Mi-

nuten, 1 : 1000 $As_2 O_3$ in 20-30 Minuten, 1 : 10000 $As_2 O_3$ in 60-90 Minuten, in 1 : 20 Mill. vermögen Paramäcien ohne Schaden zu leben. Diese schwache Concentration wirkt nach unseren Beobachtungen die sich darin mit denen von R. SAND (22) decken, auf die Proliferationsfähigkeit in förderndem Sinn.

Bei den Festigungen der Paramäcien gingen wir im wesentlichen denselben Weg, wie eben bei den Colpidien gezeigt wurde. Nun stellten wir von Anfang an die Endkonzentration der Kulturlösung fest. Wir fügten zur Zuchtflüssigkeit soviel arseniger Säure (bezw. Natrium arsenicosum), dass zunächst eine Konzentration von 1 : 20 Mill. resultierte. Durch weitere Zugabe von $As_2 O_3$ stiegerten wir die Konzentration bis 1 : 5 Mill. innerhalb 4 Tagen oder in 2 Tagen bei den im Thermostaten von 30° gezüchteten Paramäcien. Das Verhalten der in solcher Weise vorbehandelten Infusorien ist Tabelle I und II zu entnehmen.

TABELLE I.

1 : 2000 AS_2O_3

Zeit	Normal	Gefestigt
25′	Geringe Beweglichkeit.	Gute Beweglichkeit
40′	Fast völlig gelähmt.	»
2 h.	Schatten.	»
5 h.	—	Schatten.

TABELLE II.

1 : 200 AS_2O_3

Zeit	Normal	Gefestigt
20′	Geringe Beweglichkeit.	Gut beweglich.
30′	Lähmung, beginnende Schatten.	beweglich.
40′	Schatten.	1/3 noch beweglich.
80-90′	—	Schatten.

In der zweiten Serie unserer As-Versuche züchteten wir Paramäcien in Natrium arsenicosum-Salatwasserflüssigkeiten von den Endkonzentrationen 1 : 20 Mill., 1 : 10 Mill., 1 : 5 Mill. Die Tiere wurden in diesen Lösungen jeweilig eine Woche gehalten. Ihr Verhalten gegen eine tötliche arsenige Säuredosis geht aus den hier gegebenen Tabellen III u. IV hervor. Die in 1 : 5 Mill. Natrium arsenicosumlösungen gezüchteten Infusorien zeigten zunächst dieselbe Widerstandsfähigkeit gegen 1 : 200 $As_2 O_3$ wie die in 1 : 20 u. 1 : 10 Mill. gehaltenen Tierchen. Während die in den letzgenannten dünnen Lösungen herangezüchteten Tiere aber vom 4-7 Tage eine, wenn auch geringe Steigerung ihrer Arsenfestigkeit erfuhren, fällt an den in 1 : 5 Mill. gehaltenen Paramäcien der Rückgang ihrer Resistenz auf. Diese Resistenzverminderung ging Hand in Hand mit einer gewissen Vermehrungshemmung. Diese mit brauchbarer Regelmässigkeit auftretretende Erscheinung zeigt, dass bei unserer Versuchsanordnung die für die Erzielung einer As-festigkeit optimale Concentration zwischen 1 : 5 Mill. u. 1 : 20 Mill. liegt. In der Tabelle IV kommt auch eine bemerkenswerte Beobachtung zum Ausdruck, auf die besonders hingewiesen werden muss : lässt man die tötliche (1 : 200) $As_2 O_3$ Lösung auf die in toxischen Concentrationen gezüchteten Tiere wirken, so ging regelmässig ein beträchtlicher Teil der gefestigten Tiere in fast derben Zeit zu Grunde wie die normalen. Ausserlich, mit blossem Auge sichtbar, dokumentierte sich diese Erscheinung dadurch, dass in dem Uhrschälchen, das die As-Tiere enthielt, neben einem kleinen, den Boden des Schälchens bedeckenden Häufchen weisser, unbeweglicher Punkte eine relativ grosse Zahl beweglicher Tiere vorhanden war, während die normalen Paramäcien mit weniger Ausnahmen ein unbewegliches, am Grunde liegendes Klümpchen bildeten. (Dabei war aber keine Agglutination im Spiel, es handelte sich einfach um eine Sedimentierung).

TABELLE III.

1 : 200 AS_2O_3.

Zeit	3 Tage in			
	1 : 20 Mill.	1 : 10 Mill.	1 : 5 Mill.	Normal
5′	Gut beweglich	Gut bewegl	Gut bewegl.	Geringe bewegl.
10′	»	»	»	»
20′	»	»	»	beginnende Lähmg.
30′	»	»	»	gelähmt
40′	»	»		Schatten
50′	»	»		—
60′	»			—
75′	die meisten bewegl.	viele bewegl.	fast. sämtl. bewegl.	—
130-140′	Schatten	Schatten	Schatten	

TABELLE IV.

1 : 200 AS_2O_3.

Zeit	6 Tage in			
	1 : 20 Mill. AS_2O_3	1 : 10 Mill.	1 : 5 Mill.	Normal
10′	Gut bewegl.	Gut bewegl.	Langs. bewegl.	Geringe bewegl.
20′	»	»	»	beginnende Lähm.
40′	»	bewegl.	bewegl.	gelähmt
60′	»	»	etwa 1/2 gelähmt	Schatten
2 h.	»	»	nur wenige bewegl	—
2 1/2 h.	noch einige bewegl.	gelähmt.	beg. Schatten	—

2. Antimon.

Im Anschluss an die As-Versuche mit Colpidien, über deren unbefriedigende Resultate oben berichtet ist, wandten wir uns dem Antimon zu; für alle hierhergehörenden Untersuchungen bedienten wir uns wässriger Lösungen des Kaliumantimonyltartrats, das Brechweinstein, gegen die sich unsere Infusorien von vornherein ziemlich widerstandsfähig zeigten. Gaben wir wie früher zu 0,5 cm. Colpidienlösung 0,5 ccm. Brechweinsteinlösung, so wurden von einer Lösung:

1 : 100 Tart. stibiat, die Tiere in rund 15 Stunden
2,5 : 100 » » » » 7-8 »
5 : 100 » » » » 2,5 »

getötet (bei Zimmertemperatur von 17° C.).

Die von NEVEN (15) im Reagensglas untersuchten Trypanosomen erwiesen natürlich eine wesentlich geringere Resistenz. So immobilisierte eine 1 : 20000 Lösung die Parasiten in 12 Minuten, eine Concentration in der die Colpidien 1 1/2 Tage ohne sichtliche Beeintrachtigung ihrer Beweglichkeit lebten.

Die geringe Wirksamkeit des Brechweinsteins bedingte natürlich tagelange Beobachtung der Versuchstierchen.

In der bei den As-Versuchen geschilderten Weise züchteten wir unter vorsichtiger Zugabe einer Tartarstibiat-Lösung 1 : 100 die Versuchscolpidien. In derselben Versuchsanordnung wie früher ergab sich, dass die 4 Tage lang mit entsprechend vorsichtigen Dosen behandelten Protozoen sich gegen eine 5 % Brechweinsteinlösung erheblich längere Zeit halten als die nicht vorbehandelten Vergleichstiere. Die Sb. Stämme zeigten sehr bald erhöhte Lebhaftigkeit ihrer Bewegungen, und die Vermehrung erfolgte in den Sb-Kulturen deutlich in gesteigerter Weise. Offenbar kommen dem Tart. stibiat in dünnen Lösungen die Teilung stimulierende Fähigkeiten zu, wie wir beim As berichteten. Auch die aus den Sb.-Stämmen ohne weitere Zugabe des Antimonsalzes in unvermischten Kulturflüssigkeiten weiter gezüchteten Colpidien, in den Protokollen als SbII Stämme geführt, erwiesen dieselbe Resistenz wie die entsprechenden Mutterstämme, von denen sie in nichts zu unterscheiden waren. Der Frage, wie lange sich die erworbene Eigenschaft der Antimonfestigkeit verfolgen lässt, konnten wir aus äusseren Grunde nicht näher treten.

Die arsenige Säure wurde auch in ihrer Wirkung auf die Sb-Tiere untersucht. Es zeigte sich, dass die mit dem Antimondoppelsalz vorbehandelten Infusorien fast in derselben Zeit der tötlichen arsenige Säurekonzentration verfielen wie die normalen oder wie die As-Tiere

(Colpidien). Bei den Bemühungen, die As-festigkeit der Tart. stämme durch Vorbehandlung mit einer Mischung von As und Sb zu steigern, stiessen wir auf die bemerkenswerte Beobachtung, dass die Combination von As und Sb auf Normalstämme intensiver wirkt als eine gleich starke Dosis einer der beiden Componenten. Von den As-Untersuchungen her wissen wir, dass 1 : 2000 As_2 O_3 bis zur Tötung der Colpidien (nicht Paramäcien) rund 3 Stunden braucht, während für eine 2,5 % Tart. Stibiatlösung bis zur völligen Entfaltung der Wirkung eine Zeitdauer von 7-8 Stunden gefordert werden muss. Liessen wir nun beispielweise eine aus gleichen Teilen 1 : 3000 As_2 O_3 und Tart. Stibiat 1 : 100 hergestellte Mischung auf vorher unbeeinflusste Stämme wirken, so war in allen Fällen die Geschwindigkeit auffallend, mit der eine Immobilisation der Infusorien in die Erscheinung trat. Wir geben diese Beobachtung hier wieder, ohne uns in Versuche von Erklärungen einzulassen.

Im Verlauf unserer Sb-Untersuchungen hatten wir durch Zugabe von Tart. Stibiat zu einer As-Kultur einen As-Tart-Stibiat-Stamm erzielt (in den Protokollen als As-Sb Stamm notiert). Dieser Stamm, eine äusserst lebhafte Kultur, wies bei einer Reihe modifiezerter As-Sb-gemischversuche eine Besonderkeit auf, die hier hingewiesen werden soll. Wir begannen die Versuche damit, die Sb, As, und den genannten As-Sb-Stamm mit einer As_2 O_3 Lösung 1 : 3000 zu versetzen. Aus Tabelle VIII geht hervor, dass die längere Zeit in dieser Lösung gehaltenen Tiere des Sb, des As-Stammes der Wirkung einer 2,5 % Lösung von Brechweinstein nicht so rasch erlagen, wie der As-Sb Stamm. Vielleicht liegen hier ähnliche Verhältnisse vor, wie bei den Fällen von Sublimatüberempfindlichkeit, die gleich näher geschildert werden soll.

TABELLE V.

5 : 100 Tart. stibiatus.

Zeit	Sb-Stamm I	Sb-Stamm II	Normal
20'	Gut bewegl.	gut bewegl.	gut bewegl.
120'	gut bewegl.	bewegl.	etwa die Hälfte gelähmt
3 h.	fast alle gut bewegl.	bewegl.	Schatten
12-14 h.	Schatten	Schatten	—

TABELLE VI.

As_2O_3 1 : 200

Zeit	Normal St.	Sb-Stamm	As-Stamm
30′	fast völlig gelähmt	ger. Bewegl	die meisten gering bewegl.
61′	Schatten	gelähmt	gelähmt

TABELLE VII.

As_2O_3 1 : 3000 + Tart. stibiat. 2,5 : 100.

Zeit	Sb-Stamm	As-Stamm	Normal Stamm
60′	gut bewegl.	lebhaft bewegl.	verminderte Bewegl.
90′	»	gut bewegl.	gelähmt
2 h.	»	»	Schatten
6-8 h.	gelähmt	gelähmt	—

TABELLE VIII.

As_2O_3 1 : 3000.

Zeit	Sb-Stamm	As-Sb-Stamm	As-Stamm	Normal
2 1/2 h.	gut bewegl.	gut bewegl.	etwas verm. Bewgl.	beg. Lähmg.
	2,5 : 100 Tart. stibiat.			
7-8 h.	die meisten gut bew.	gelähmt u. Schatten	grösstenteils bew.	

3. Sublimat.

Versuchstiere waren wiederum Colpidien. Die verschiedenen Concentrationen von $HgCl_2$ wirken auf unsere Colpidien so: In einer aus 0,5 ccm Kultur in 0,5 ccm Giftlösung 1 : 10 Mill. hergestellten Mischung lebten die Tiere einige Tage ohne Schaden. Schliesslich findet, offenbar infolge von Nahrungsmangel, Encystierung statt.

1 : 2000 tötet die Infusorien blitzartig.
1 : 25000 » » in rund 60 Minuten.

Liessen wir eine $HgCl_2$ Lösung von einer Concentration die eine nicht zu raschen Tötung bedingte, auf die Colpidien einwirken, so fiel neben der Beweglichkeitsherabsetzung vor allem das sichtbare Kleinerwerden des Tierchen auf. In Lösungen 1 : 10 Mill. fand innerhalb einiger Tage eine erhebliche Reduktion der Grösse statt, für die der Nahrungsmangel kaum allein verantwortlich zu machen war.

Die Versuche zur Erziehung einer Sublimatfestigkeit wurden in analoger Weise wie bisher vorgenommen. Erhöhte Widerstandsfestigkeit gegen tötliche Lösungen war rasch zu erreichen, wenn man bei der Gewöhnung eine bestimmte Concentration nicht überschritt. Aus Tabelle IX, in der die Versuchsergebnisse vereinigt sind, ist zu er-

TABELLE IX.

$HgCl_2$ 1 : 26000

Zeit	4 Tage mit 1 : 10 Mill.	4 Tage mit 1 : 1 Mill.	4 Tage mit 1 : 100000	Arsacetin Stamm	Normal	Zeit
20'	lebhaft	lebhaft bew.	verminderte Bewegl.	Kugeln. Lähm u. beg. Schatten	träge Beweg.	20'
30'	»	»	—	fast völlig Schatten	—	30'
40'	»	»	—	—	beg. Lähm.	40'
50'	gut bewegl.	»	gelähmt beg. Schatten	—	Lähmg.	50'
60-70	»	gut bewegl.	—	—	Schatten	60-70'
2 h.	die meisten gut bewegl.	Kugeln. beg. Lähmg.	—	—	—	2 h.
2 1/2 h.	viele gut bew.	gelähmt	—	—	—	2 1/2 h
3 h.	beg. Lähm.	beg. Schatten	—	—	—	3 h.
3 1/2 h.	Lähm	Schatten	—	—	—	3 1/2 h.
4 h.	beg. Schatten	—	—	—	—	4 h

sehen dass die Grenze für unsere Tiere zwischen 1 : 500000 und 1 : 100000 liegt. Alle Stämme, die mit stärkeren als mit 1 : 300000 Lösungen, gezüchtet wurden, bewiesen entweder keine oder im Gegenteil vermehrte Resistenz gegen eine tötliche Dosis $HgCl_2$. Diese Beobachtung erschien uns zunächst unverständlich. Denn bei den Infusorien, die mit concentrierten Lösungen gezüchtet waren, liess

sich zunächst keine Herabsetzung der Teilungsfähigkeit feststellen. Und die Beweglichkeit wies ebensowenig eine merkliche Verminderung auf. Eine grosse Zahl der Tierchen schoss im Gegenteil mit äusserter Lebhaftigkeit in der Flüssigkeit umher. Diese Erscheinung bietet die mögliche Erklärung. Diese gesteigerte Beweglichkeit ist jedenfalls als der positive Vorschlag einer Lähmung zu verstehen einer beginnenden Vergiftung, für die aber sonstige Merkmale fehlten.

In unsere Sublimattabelle ist noch ein bemerkenswertes Ergebnis aufgenommen. Der Arsacetinstamm, über den bei den As-Versuchen näher berichtet ist, wurde auf sein Verhalten gegen $HgCl_2$ mitgeprüft. Die Tierchen dieses Stamms, durch lebhafte Beweglichkeit ausgezeichnet, verfielen der Wirkung des Sublimats mit auffallender Geschwindigkeit. In einer Reihe von Versuchen erwiesen sie sich als 2-3 mal weniger resistent als die Exemplare eines gleich alten und ebenso lebhaften Normalstammes.

4. Kupfer.

Die Leichtigkeit, mit der eine Gewöhnung unserer Infusorien an das doch sehr wirksame Sublimat zu erzielen war, legte uns nahe, mit einem weiteren Schwermetall Anpassungsversuche anzustellen. Schon BINZ (3) beobachtete, dass die eiweissfällenden Schwermetalle sich durch besondere Giftigkeit auch gegenüber den Infusorien auszeichnen. Die Scheu, Infusorien mit destilliertem Wasser zusammenzubringen, rührt ja bekanntlich von der alten Beobachtung her, dass schon die Spuren von Kupfer, die sich in destilliertem Wasser finden wenn es die gebräuchlichen Kupferkühler des Destillationsapparats passiert hat, zu einer sichtlichen Schädigung der Tierchen genügen. Dass es bei vorsichtiger Gewöhnung gleichwohl gelingt, Infusorien auch gegen dieses äusserst starke Gift Resistenz anzuzüchten, soll der letzte Abschnitt unserer Untersuchungen zeigen.

Zu unseren Kupferversuchen bedienten wir uns einer wässrigen Lösung eines nach dem Typ des Brechweinsteins gebildeten Kupferdoppelsalzes, des *Kupferoxydnatriumtartrats*. (Stammlösung mit einem *CuO*-Gehalt von 20 mg CuO in 1 cc) das Eiweiss nicht fällt.

Zur Methodik ist nach der ausführlichen Schilderung in den früheren Abschnitten nur zu bemerken, dass wir analog den mit den Paramäcien angestellten As-Versuchen den Gesamtkupfergehalt der Kulturlösung von vornherein bestimmten. Nachdem festgestellt war dass unsere Paramäcien durch eine Cu-weinsteinlösung (wie wir die Cuoxydnatr.-tartratlösung nennen wollen) von 1 : 500 sofort getötet werden (0,5 ccm Infusorien + 0,5 ccm Cuweinstein 1 : 500), bestimmten wir

zur tötlichen Lösung eine Concentration 1 : 5000, die ana partes mit der Infusion zusammengebracht, die Infusorien in rund 30 Minuten immobilisiert. Die für die Gewöhnung wirksame Breite beginnt bei 1 : 50 Mill. und hat bei unseren Versuchen ihr Ende bei 1 : 5 Mill. Die Züchtung der Paramäcien erfolgte also in Salatwasserinfusionen deren Cu-gehalt in 5-6 Tagen von 1 : 50 Mill. bis 1 : 5 Mill. gesteigert wurde. Der Aufenthalt in diesen Concentrationen, in denen übrigens eine ausserordentlich lebhafte Vermehrung statthatte, verlieh den Paramäcien in der genannten Zeit ganz erhebliche Widerstandsfähigkeit gegen tötliche Lösungen, wie aus den Tabellen X und XI ersichtlich ist. Der Resistenzgrad der Cu-Paramäcien war im Vergleich zu den bisher erreichten enorm hoch.

Um nun zu erweisen, ob es sich bei dieser enormen Kupferfestigkeit um eine specifische Eigentümlichkeit handelt oder ob diese hohe Widerstandsfähigkeit gegen Kupfer sich auch bei anderen Metallen wiederholt, wurden weitere Versuchen angestellt. Die Cu-Tiere, und zwar bedienten wir uns der widerstandfähigsten wurden in ihrem Verhalten gegen tötliche Arsenlösungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Cu-festen Paramäcien zugleich erhebliche Festigkeit gegen Arsen erlangt hatten. Sie widerstanden der Wirkung der tötlichen Concentration von arseniger Säure ebenso lange als die Arsentiere.

Umgekehrt erwiesen die Arsentiere, auch hier wieder die widerstandfähigsten, gegen Cu eine unerhebliche Resistenz, wie aus Tabelle XII hervorgeht.

TABELLE X.

Kupferoxydnatriumtartrat 1 : 5000.

Zeit	Cu-Stamm 1 : 50 Mill. – 1 : 5 Mill.	Normal Stamm
5′	lebhaft bewegl.	beweglich
15′	»	Verminderte Beweglichkeit
30′	»	beg. Lähmung
60′	gut bewegl.	Schatten
2 h.	»	
4 h.	die meisten bewegl.	
6 h.	beg. Schatten	

TABELLE XI.

As_2O_3 1 . 10000.

Zeit	As-Stamm	Cu-Stamm	Normal Stamm
10′	lebhaft bewegl.	sehr lebhaft bewegl.	gut beweglich
20′	»	»	verminderte Bewegl.
30′	»	»	»
40′	gut bewegl.	gut bewegl.	beg. Lähmung
60′	»	»	Lähmung u. Schatten
2 Std.	beg. Lähmung	die meisten bewegl.	—
2 1/2 Std	Lähmung u. Schatten	relativ viele bewegl. beg. Lähmung	—

TABELLE XII.

Cuoxydnatriumtartrat 1 : 5000.

Zeit	Cu-Stamm	As-Stamm	Normal Stamm
10′	lebhaft bewegl.	lebh. bewegl.	
30′	—	gut bewegl.	Lähmung
60′	—	die meisten gut bewegl.	gelähmt und Schatten
90′	—	beg. Lähmung	—
2 h.	gut bewegl.	Lähmung und Schatten	—
4 h.	viele gut bewegl.	—	—
6 h.	beg. Schatten.	—	—

Obwohl Versuche mit weiteren chemischen Agentien an den Cu-Paramäcien nicht angestellt wurden, so lässt sich doch sagen, dass nach unseren Erfahrungen bei der Cu-Festigkeit unserer Infusorien eine specifisch für Kupfer angezüchtete Resistenz nicht vorliegt.

Die Kentnisse über Giftgewöhnung bei Infusorien haben mit unseren Feststellungen eine bescheidene Erweiterung erfahren, insofern es uns gelang, nachzuweisen dass Colpidien bezw. Paramäcien tötlichen Concentrationen von arseniger Säure, Brechweinstein, Sublimat und Kupferoxydnatriumtartrat grössere Widerstandsfähigkeit entgegensetzen, wenn sie in entsprechend dünnen Lösungen der betreffenden Agentien auch nur kurze Zeit gehalten und weiter gezüchtet werden. Die Resistenzgrade, die wir mit unserer Methode zu erreichen vermochten, sind sehr verschieden. Am auffallendsten ist die Tatsache, dass es uns nicht gelang, bei Colpidien, die in As-Lösungen gehalten wurden, irgend welche erhebliche Resistenz gegen tötliche As-Lösungen nachzuweisen ; ferner die Beobachtung, dass den Paramäcien auch nur ein geringer Grad von As-Festigkeit beizubringen war. Wenn nämlich die Cu-Tiere durch ihre Vorbehandlung eine solche Widerstandfähigkeit erlangten, dass sie der tötlichen Lösung von 1 : 5000 Cu-weinstein sechsmal so lang widerstanden als normale Tiere, so verfielen die As-Tiere, selbst die resistentesten, schon in der doppelten bis kaum dreifachen Zeit der Wirkung einer toxischen $As_2 O_3$ Lösung. Eine Erklärung für diese merkwürdige Erscheinung vermögen wir nicht zu geben.

Für die Tatsache der Giftgewöhnung und schliesslichen Giftfestigkeit der Protozoen kommt aber noch ein wesentlicher Faktor in Betracht. Fast alle Autoren heben die grossen individuellen Verschiedenheiten in der Empfindlichkeit gegen Gifte bei verschiedenen Exemplaren desselben Stammes hervor, RÖSSLE (20) u. a. berichten dass sich unter hunderten von Infusorien immer einige finden, die *primär* höhe Resistenz zeigen. Es ist denkbar, dass die tripocid.-festen Stämme EHRLICHS eben nur die Abkömmlinge oder besser gesagt, die Meronten der primär resistenten Parasiten darstellten. Der Lösung dieser Frage ist für die Trypanosomen jedenfalls nicht nahezukommen, denn sie besitzen verwickelte Entwiklungscyklen, die sie instande setzen, allen möglichen Angriffen auszuweichen. « Sie können in geeigneten Augenblicken verschiedene Latenz- und Resistenzformen annehmen » (PROWAZEK, 1. c.) Und DAVENPORT und NEAL begegnen dem Emwand, dass es sich bei ihren Giftgewöhnungen (Stentor coerulens) eben auch nur um eine Auswahl primär festen Tiere, handeln könnte, mit dem Befund ihrer Kulturen, in denen sie fast nie tote Infusorien gefunden hätten. Für unsere Fälle von Giftfestigkeit glauben wir die Annahme einer Selektion im Darwinschen Sinn mit einiger Sicherheit zurückweisen zu können.

Wir haben wenigstens in allen Züchtungsserien das rasche Angehen der Kulturen beobachten können. Es ist nicht anzunehmen,

dass ein geringer Rest von überlebenden primär-resistenten Tieren stets eine solche Fruchtbarkeit entwickelte, dass er schon nach einigen Tagen, und das war immer der Fall, mit dem Ausgangs-oder Normalstamm numerisch auf derselben Höhe war. Indes muss zugegeben werden dass die Frage der Auslese (im obigen Sinne) erst dann entschieden werden kann, wenn eine Protozoengattung zur Verwendung gelangt die eine genaue, zahlenmässige Registrierung und Beobachtung des Einzelindividuums ermöglicht.

Zusammenfassung.

Unsere Untersuchungen ergeben also :

1. Der Aufenthalt und die Züchtung in entsprechend dünnen Lösungen von arseniger Säure (bezw. Natr. arsenic.) von Brechweinstein, Sublimat und Kupferoxydnatriumtartrat verleiht Colpidien und Paramäcien erheblich erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen eine tötliche Lösung der betreffenden chemischen Agentien.

2. Die stärksten Grade von Giftfestigkeit waren bei im wesentlichen gleicher Methodik mit dem Kupferdoppelsalz, die schwächsten mit der arsenigen Säure zu erzielen.

3. Der schliesslich erreichte Resistenzgrad ist abhängig von der Zeit, während der die Versuchstiere in den Lösungen gehalten werden, richtet sich aber besonders nach der Concentration der Kulturlösung.

4. Bei der Gewöhnung dürfen bestimmte Concentrationen nicht überschritten werden sonst stellt sich Überempfindlichkeit der Versuchstiere ein. Entsprechende Beobachtungen ergaben sich bei den Arsen- und Sublimatversuchen an Paramäcien.

5. Die Antimonfesten Tiere sind nicht zugleich gegen Arsen fest.

6. Ein Gemisch von Arsen und Antimon beeinflusst normale Tiere bedeutend rascher als dem arithmetischen Mittel der Wirkung beider Mittel entspricht.

7. Die aus einem Antimonstamm in reiner Kulturlösung fortgezüchteten Colpidien erwiesen sich so antimonfest wie ihre Mutterstamm.

8. Die Kupferfestigkeit der Paramäcien ist nicht specifisch, insofern die Kupferstämme mit der erhohten Widerstandfähigkeit gegen Kupfer zugleich Arsenfestigkeit erlangt hatten.

9. Umgekehrt erwiesen die (geringgradig) arsenfesten Paramäcien keinen nennenswerten Grad von Kupferfestigkeit.

Litteratur.

1. W. Baratt : *Die Wirkung von Säuren und Basen auf lebende Paramäcien.* Z. f. allg. Physiolog. Bd. IV, 1904, 438-482.
2. — *Die Addition von Säuren und Alkalien durch lebendes Protoplasma.* Z. f. allg. Physiolog. Bd. V, 1905, 73-94.
3. Binz u. Schulz : *Die Arsengiftwirkung von chemischer Standpunkt betrachtet.* Arch. f. exp. Patholog. u. Pharmakolog. XI, 206-230.
4. Bokorny, Th. : *Vergleichende Studien über die Giftwirkung verschiedener chem. Substanzen bei Algen und Infusorien.* Pflügers Archiv, Bd. 64, 262-306 (1896).
5. S. Frank Daniel : *Adaptation and Immunity of lower organisms to Ethyl alkohol.* Autoreferat in Arch. f. Entwicklungsmechanik, 28, 1909.
6. Davenport und Neal : *On Akklimatization of organisme to poisonous chemical Substances.* Arch. f. Entw. Mechanik II, 1896.
7. Ehrlich P. : *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie,* 1910.
8. v. Fürth O., *Chemische Physiologie niederer Tiere.* Fischer, Jena 1903.
9. Giemsa u. Prowazek : Arch. f. Schiffs-Tropenhygiene. Beihefte XII, 1908.
10. Kasauzeff : *Experimentelle Untersuchungen über Paramäcium caudatum.* Inaug.-Diss. Zurich 1901.
11. Korentschewsky : *Vergleichende pharmakolog. Untersuchungen über die Wirkung von Giften auf einzellige Organismen.* Schmiedebergs Arch. 49.
12. Kuster E. : *Kultur der Mikroorganismen.* Teubner, Leipzig 1907.
13. Loew O. : *Ein natürliches System der Giftwirkungen.* München 1893.
14. — *Über Giftwirkung.* Arch. f. ges. Physiolog., 40.
15. O. Neven : *Über die Wirkungsweise der Arzneimittel bei Trypanosomiasis.* Inaug.-Diss. Bern (aus dem Ehrlichschen Institut). Giessen 1909.
16. S. Prowazek : *Einführung in die Physiologie der Einzelligen (Protozoen).* Leipzig 1910.
17. A. Pütter : *Methoden zur Erforschung des Lebens der Protisten.* Handbuch der physiolog. Methodik. Leipzig 1908.
18. W. Roehl : *Über Trypanosan.* Z. f. Immunitätsforschung u. exp. Therapie, I, 1. Heft, 1908.
19. — *Heilversuche mit Arsenophenylglycin bei Trypanosomiasis.* Ibidem, 1. Teil, Bd. I, Originale.
20. R. Rössle : *Spezif. Sera geg. Infusorien.* Arch. f. Hygiene, Bd. 54.
21. — *Zur Immunität einzelliger Organismen.* Verhandlung d. Deutsche patholog. Gesellsch., 1909, Fischer, Jena 1909.

22. B. Sand : *Action thérapeutique de l'arsenic, de la quinine, du fer et de l'alcool sur les infusoires ciliés.* Annal. soc. royale des sciences médic. et naturelles de Bruxelles, 10, 1901.

23. Cl. Schilling : *Die Ehrlichsche Chemotherapie der Protozoenkrankheiten.* Therap. Monatshefte, 1901. XII.

24. Stetkewitsch, P. J. : *Methodik d. biol. Untersuchungen über die Protisten.* Arch. f. Protistenkunde, Bd. 5; 1905.

Lebenslauf.

Ich, HUGO NEUHAUS, wurde am 26 April 1885 in Ellwangen a. I. geboren. Nach dem Besuch der Volkschule und des Gymnasiums meiner Heimatstadt studierte ich von 1904-1909 Medizin an den Universitäten München, Kiel, und Freiburg. In München legte ich im Frühjahr 1907 die ärtzliche Vorprüfung, in Freiburg in Spätjahr 1909 das Staatsexamen ab. Die Abfassung vorliegender Arbeit füllte das erste Quartal meines praktischen Jahres aus.